JRC
EUROPEAN COMMISSION

ihcp
Institute for Health and Consumer Protection

Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés

Module 12

Détection quantitative du soja Roundup Ready® par ELISA

F. Eyquem

WORLD HEALTH ORGANIZATION
REGIONAL OFFICE FOR EUROPE

WELTGESUNDHEITSORGANISATION
REGIONALBÜRO FÜR EUROPA

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ БЮРО

Table des matières

Session 12

Détection quantitative du soja Roundup Ready® par ELISA

INTRODUCTION 3

LA TECHNIQUE ELISA 8

EXPERIMENTATIONS 11

REFERENCES *22*

Introduction

La détection immunologique spécifique d'une nouvelle protéine synthétisée par un gène introduit au cours d'une transformation constitue une approche alternative pour l'identification de plantes génétiquement modifiées. Il est à noter, toutefois, qu'une modification génétique n'est pas toujours spécifiquement axée sur la production d'une nouvelle protéine et ne génère pas systématiquement des niveaux d'expression protéinique suffisants pour être détectés. Par ailleurs, certaines protéines peuvent être exprimées uniquement dans certaines parties de la plante (des promoteurs à spécificité tissulaire sont déjà utilisés à des fins spécifiques) ou exprimées à différents niveaux dans diverses parties ou au cours de différentes phases du développement physiologique.

On a constaté que les niveaux d'expression des produits transgéniques se situent dans une fourchette de 0 à 2 % de la protéine soluble totale, même lorsque de puissants promoteurs constitutifs ont été utilisés pour activer l'expression (Longstaff, 1995). Dans la plupart des cas, cependant, les niveaux d'expression signalés (par ex. pour les cultures GM approuvées) sont inférieurs à la limite supérieure de 2 % (Hemmer, 1997).

Les immuno-essais sont des systèmes de mesure analytiques dans lesquels des anticorps sont utilisés comme réactifs. Les anticorps sont des protéines spécifiques isolées du sérum d'animaux qui ne se lient physiquement qu'à la substance ayant déclenché leur production. Les anticorps sont générés en injectant la substance à détecter (par ex. CP4 EPSPS, la protéine qui confère la résistance à l'herbicide Roundup) à des animaux, tels que des lapins et des souris, dont les cellules reconnaissent la substance comme étant « étrangère » et répondent en produisant des anticorps. Les anticorps sont purifiés, liés à un marqueur détectable puis utilisés en tant que réactifs pour détecter la substance d'intérêt.

Une condition requise pour l'élaboration de méthodes de détection immunologiques est de disposer d'anticorps extrêmement spécifiques dirigés contre la nouvelle protéine à détecter. Par ailleurs, l'échantillon ou les protéines d'intérêt ne doivent pas être dégradés de façon significative.

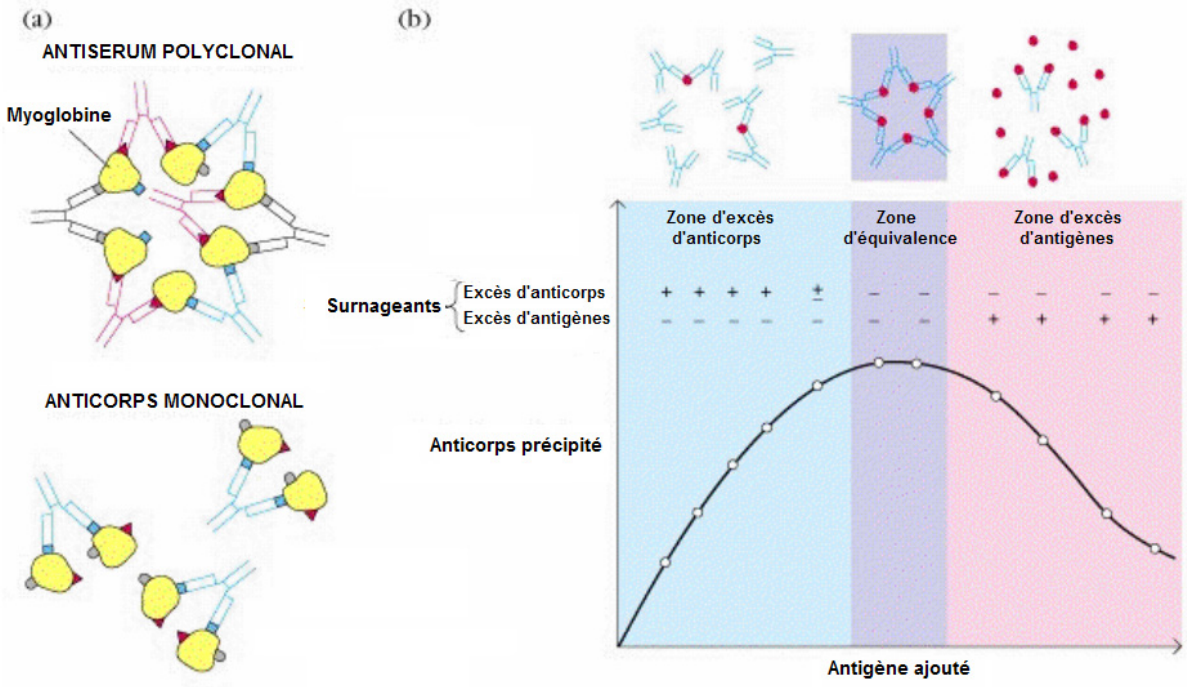
Les anticorps sont des outils puissants qui permettent aux biologistes de détecter et de quantifier les antigènes dans des mélanges complexes. Tous les immuno-essais sont basés sur la fixation spécifique d'un anticorps à un antigène.

Interactions anticorps/antigène

Lorsque les immunologistes décrivent les propriétés des anticorps en tant protéines, la plupart incluent une description de la capacité de ces molécules à précipiter des antigènes dans une solution, même si la précipitation d'anticorps n'est désormais que rarement utilisée pour isoler ou détecter des antigènes expérimentalement et les anticorps précipitent rarement les antigènes *in vivo*, excepté dans certaines maladies auto-immunes. La valeur pédagogique de la réaction de précipitation des anticorps, comme illustré à la Figure 1, est qu'elle reflète parfaitement un grand nombre de propriétés fondamentales et universelles des anticorps. Cette technique démontre entre autres que :

- les anticorps sériques (IgG) sont bivalents dans leurs réactions avec les antigènes et ont la capacité de ponter ces derniers ;
- les antigènes sont souvent multivalents dans leurs interactions avec les anticorps ;
- les anticorps sériques sont généralement polyclonaux ; et
- les anticorps sont extrêmement spécifiques en termes de structures qu'ils reconnaissent au niveau des molécules antigéniques.

Figure 1. Courbe de précipitation d'un système comprenant un antigène et ses anticorps



La représentation graphique de la quantité d'anticorps précipités par rapport à la concentration croissante d'antigènes (pour un total d'anticorps constant) révèle trois zones :

Une **« zone d'excès d'anticorps »** dans laquelle la précipitation est inhibée et l'excès anticorps peut être détecté dans le surnageant.

Une « **zone d'équivalence »** de précipitation maximale dans laquelle les anticorps et les antigènes constituent de grands complexes insolubles et ni les anticorps ni les antigènes ne peuvent être détectés dans le surnageant.

Une **« zone d'excès d'antigènes »** dans laquelle la précipitation est inhibée et l'excès d'antigènes peut être détecté dans le surnageant.

Bien que la réaction de précipitation soit particulièrement appropriée pour caractériser les interactions entre les anticorps polyclonaux et les antigènes multivalents, elle ne s'avère généralement pas très utile pour caractériser les interactions entre les antigènes et les anticorps monoclonaux, à moins que les antigènes ne présentent des épitopes identiques multiples (comme structures glucidiques répétitives présentes dans les polysaccharides). Ce n'est que dans ces conditions qu'un anticorps monoclonal monospécifique pourra ponter et précipiter un antigène. Toutefois, les anticorps monoclonaux sont généralement caractérisés par des types de mesures plus affinés fournissant des informations détaillées sur l'interaction anticorps/antigène, comme la constante d'équilibre et les taux cinétiques.

L'utilité des anticorps dans la détection et l'isolation des antigènes est démontrée par le large éventail d'applications extrêmement puissantes mises au point au fil des années. L'utilité des anticorps est aussi considérablement améliorée par leur relative stabilité dans diverses réactions de modification chimique qui modifient la structure des anticorps sans détruire leur capacité à fixer les antigènes. On a utilisé des anticorps marqués chimiquement par des composants fluorescents, magnétiques, radioactifs et autres afin de faciliter la détection ou l'isolement d'antigènes dans diverses conditions expérimentales.

Préparation d'anticorps monoclonaux

Les substances étrangères à l'organisme, comme les bactéries et virus d'autres agents infectieux, appelés antigènes, sont identifiées par le système immunitaire du corps comme étant indésirables. Nos défenses naturelles contre ces agents infectieux sont les anticorps, des protéines qui recherchent les antigènes et contribuent à leur destruction.

Les anticorps présentent deux caractéristiques très utiles. Premièrement, ils sont extrêmement spécifiques ; plus précisément, chaque anticorps se fixe et s'attaque à

un antigène particulier. Deuxièmement, une fois activés par l'apparition d'une maladie, certains anticorps continuent à conférer une résistance contre cette maladie.

La seconde caractéristique des anticorps permet d'élaborer des vaccins. Un vaccin est une préparation de bactéries ou de virus tués ou atténués qui, une fois introduits dans l'organisme, stimulent la production d'anticorps contre les antigènes qu'ils contiennent.

C'est dans la première propriété des anticorps, leur spécificité, que réside toute l'importance de la technologie des anticorps monoclonaux. Non seulement les anticorps peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques pour protéger contre les maladies, mais ils peuvent également contribuer à déceler toute une palette de maladies ainsi que la présence de drogues, produits virologiques et bactériologiques ainsi que d'autres substances inhabituelles ou anormales dans le sang.

Etant donné la diversité des utilisations de ces substances de lutte contre les maladies, leur production en quantités pures est depuis longtemps le centre de mire d'enquêtes scientifiques. La méthode conventionnelle consistait à injecter un antigène à un animal de laboratoire puis, après la formation des anticorps, à recueillir ces anticorps dans le sérum (un sérum contenant des anticorps est appelé antisérum). Cette méthode présente deux inconvénients : elle génère de l'antisérum contenant des substances indésirables et fournit une quantité très limitée d'anticorps utilisables.

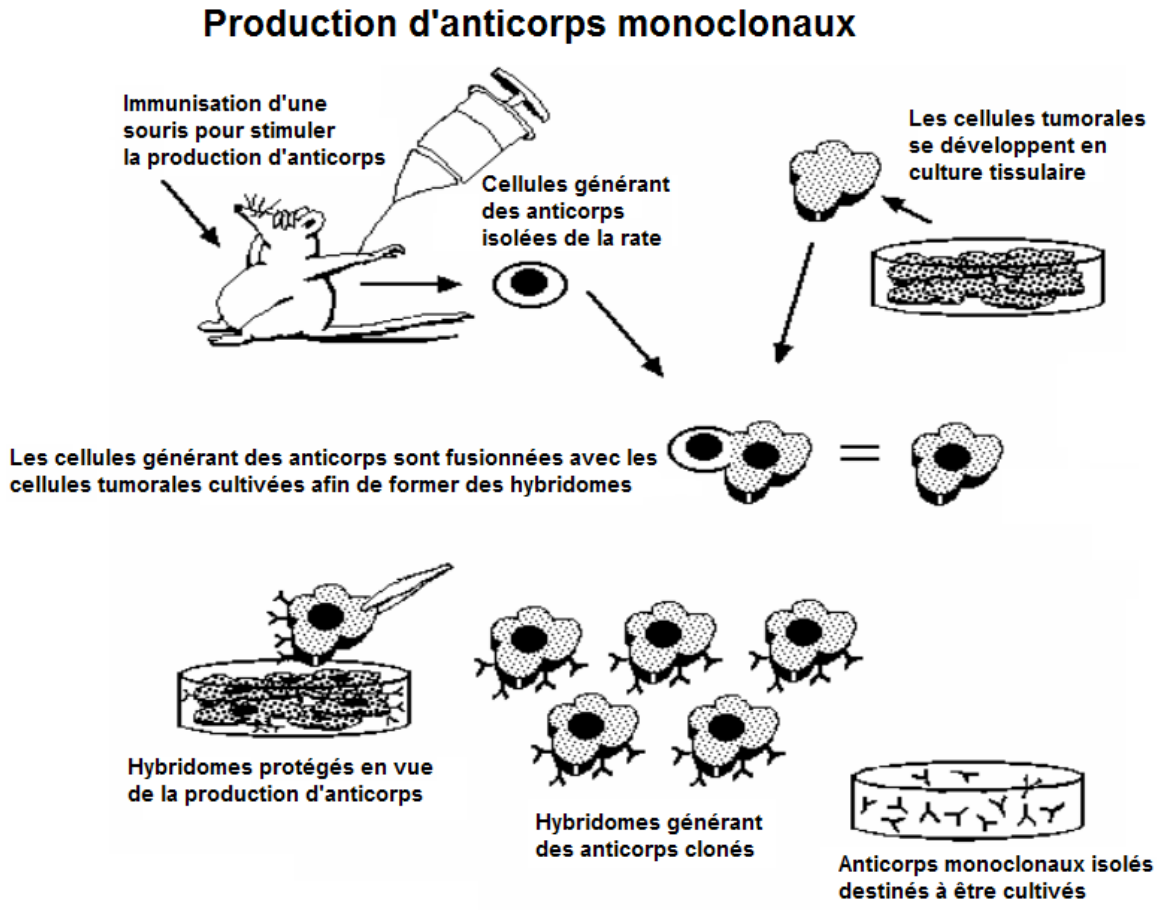
La technologie des anticorps monoclonaux permet de produire des quantités importantes d'anticorps purs en utilisant des cellules qui produisent des anticorps naturellement ainsi qu'une catégorie de cellules pouvant se développer sans interruption en culture cellulaire. Si nous constituons un hybride combinant la caractéristique d'« immortalité » et la capacité de produire la substance souhaitée, nous disposons de fait d'un système capable de produire des anticorps en permanence.

Dans la technologie des anticorps monoclonaux, des cellules tumorales pouvant se reproduire continuellement sont fusionnées avec des cellules de mammifères produisant des anticorps. Cette fusion cellulaire engendre un « hybridome », qui produira continuellement des anticorps. Ces anticorps sont qualifiés de monoclonaux parce qu'ils proviennent d'un seul type de cellule, la cellule hybridome ; en revanche, les anticorps produits par les méthodes conventionnelles découlent de préparations contenant de nombreux types de cellules ; c'est la raison pour laquelle on les qualifie de polyclonaux. Un exemple d'obtention d'anticorps monoclonaux est décrit ci-dessous.

Production d'anticorps monoclonaux

Un myélome est une tumeur de la moelle osseuse qui peut être adaptée de manière à se développer continuellement en culture cellulaire. Lorsque des cellules myélomateuses ont été fusionnées avec des cellules spléniques de mammifères produisant des anticorps, on a constaté que les cellules hybrides résultantes (ou hybridomes) produisent de grandes quantités d'anticorps monoclonaux. Ce produit de fusion cellulaire allie les qualités souhaitées des deux différents types de cellules : la capacité de se développer continuellement et la capacité de produire de grandes quantités d'anticorps purs.

Etant donné que les cellules hybrides sélectionnées ne produisent qu'un anticorps spécifique, les anticorps sont plus purs que les anticorps polyclonaux produits à l'aide de techniques conventionnelles. Ils sont potentiellement plus efficaces que les médicaments traditionnels utilisés pour lutter contre les maladies, étant donné que ces derniers attaquent non seulement la substance étrangère, mais également les propres cellules de l'organisme, ce qui entraîne parfois des effets secondaires indésirables, comme par exemple des réactions allergiques. Les anticorps monoclonaux attaquent uniquement la molécule cible et entraînent peu, voire aucun effet secondaire.


Production d'anticorps monoclonaux
Immunisation d'une souris pour stimuler la production d'anticorps
Cellules générant des anticorps isolées de la rate
Les cellules tumorales se développent en culture tissulaire
Les cellules générant des anticorps sont fusionnées avec les cellules tumorales cultivées afin de former des hybridomes
Hybridomes protégés en vue de la production d'anticorps
Hybridomes générant des anticorps clonés
Anticorps monoclonaux isolés destinés à être cultivés

La technique ELISA

Définition

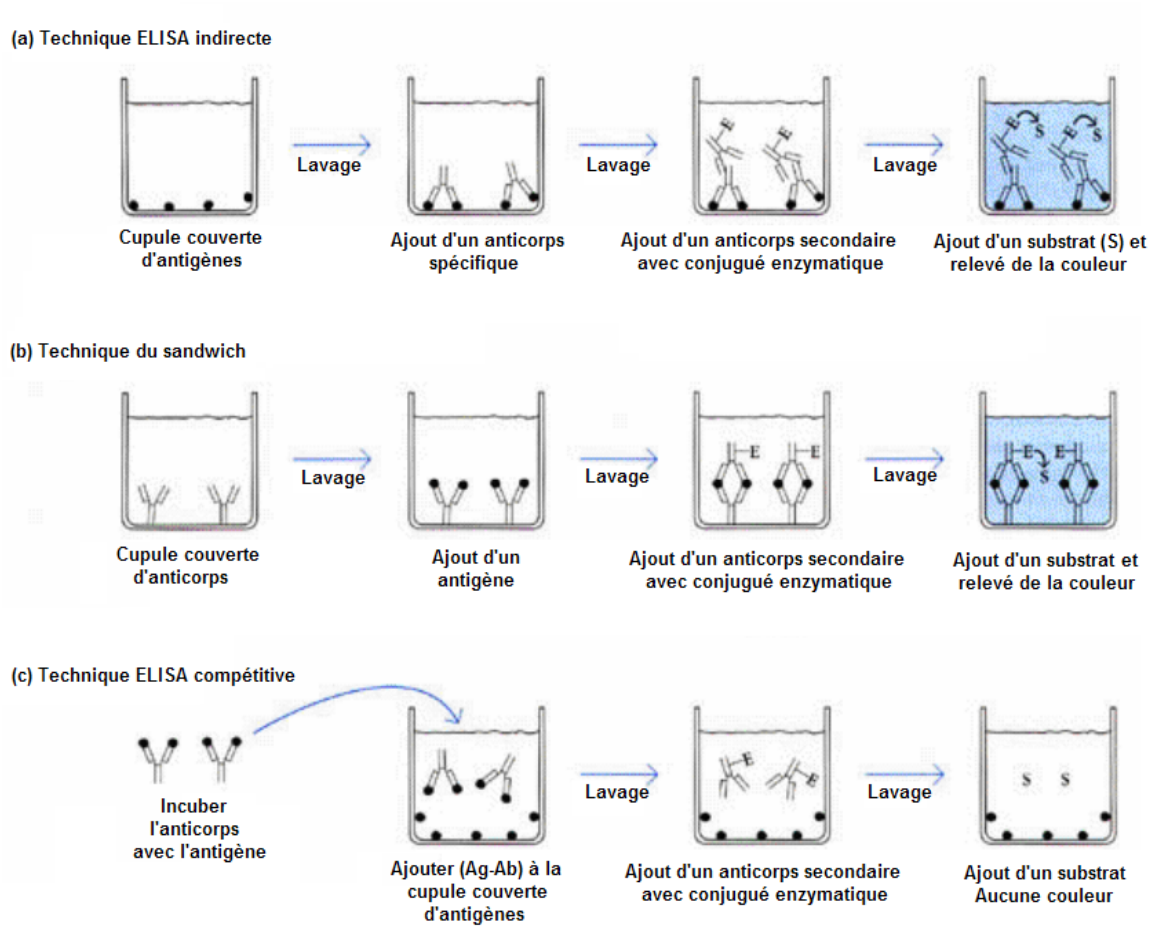
Enzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay (essai d'immunoabsorption enzymatique) : tout essai immunoenzymatique utilisant un immunoréactif enzymatique (antigène ou anticorps) et un immunoadsorbant (antigène ou anticorps lié à un support solide). Il existe toute une série de méthodes (par ex. liaison compétitive entre le réactif marqué et l'inconnu non marqué) permettant de mesurer la concentration inconnue.

La technique ELISA (Clark & Adams, 1977) repose sur les interactions spécifiques entre les anticorps et les antigènes. Les réactifs clés dans le cadre des tests ELISA sont les anticorps, des protéines solubles produites par le système immunitaire en réponse à une infection engendrée par une substance étrangère (appelée « antigène »). Dans le cas de la détection des OGM, l'antigène peut être la protéine récemment synthétisée.

La technique ELISA a souvent été mise en œuvre pour évaluer, à un stade expérimental, le niveau d'expression des protéines synthétisées par le gène récemment introduit. Des informations concernant la production et l'utilisation d'anticorps spécifiques peuvent ainsi être trouvées dans de nombreux articles décrivant les développements de plantes transgéniques (Mohapatra *et al.*, 1999).

Seuls quelques anticorps spécifiques dirigés contre les protéines résultant des transgènes utilisés dans les cultures génétiquement modifiées autorisées sont disponibles dans le commerce: quelques exemples sont les anticorps contre le produit du gène *npt*II, NPTII, ou APH(3')II et contre le produit du gène *gus*.

Il existe 3 manières différentes d'effectuer un Test ELISA :

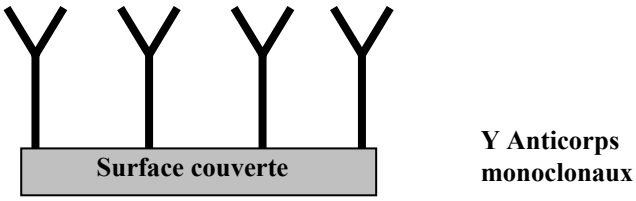


Une méthode ELISA permettant la détection spécifique du soja Roundup Ready® a été mise au point, testée et validée par Lipp *et al.* (2000).

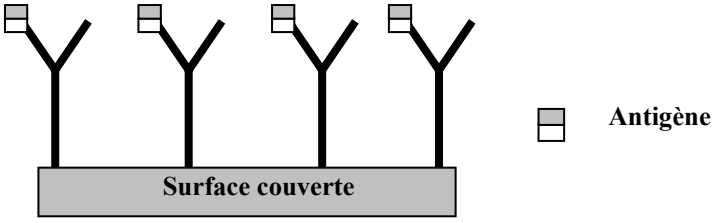
Cette méthode repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine CP4-EPSPS (5-énolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, enzyme issue de la souche CP4 de l'*Agrobacterium* sp.) (Padgette *et al.*, 1995), la protéine qui confère la tolérance à l'herbicide Roundup du soja Roundup Ready®. Les résultats préliminaires indiquent que cette méthode (qui consiste à utiliser un kit ELISA disponible dans le commerce) est capable de détecter la présence d'OGM dans le soja brut à des concentrations comprises entre 0,3 % et 5 %.

Principe

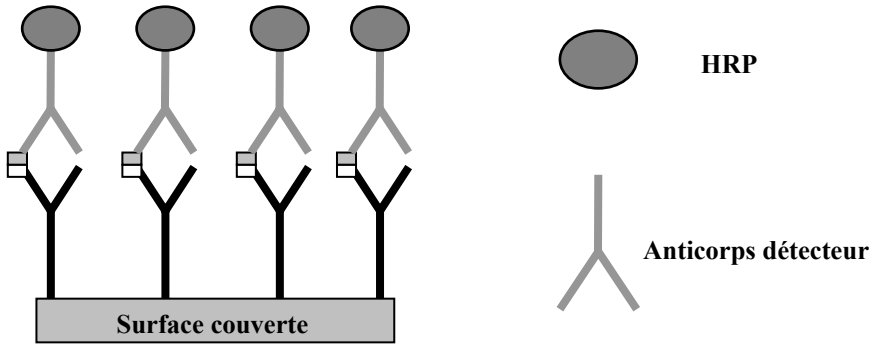
La technique ELISA directe en sandwich permet de détecter la protéine CP4 EPSPS comme illustré sur les figures ci-dessous :



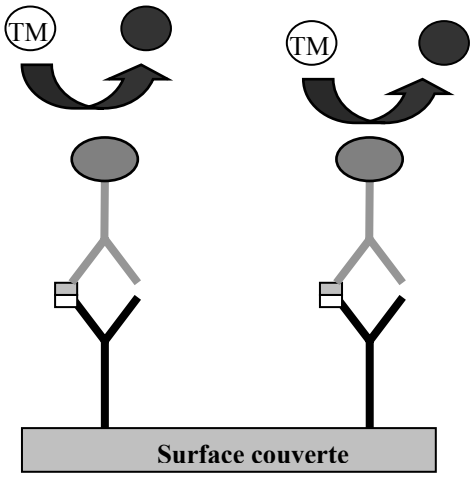
La surface d'une plaque de microtitration est recouverte d'un anticorps de capture monoclonal spécifique.



Lorsque l'échantillon considéré est ajouté, l'anticorps de capture fixe l'antigène. Les composants libres de l'échantillon sont éliminés par lavage.



Après le lavage, un anticorps polyclonal lié par covalence à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté, et est spécifique pour un second site antigénique sur la protéine CP4 EPSPS liée.



Après le lavage, un chromogène est ajouté, à savoir de la tétraméthylbenzidine pour peroxydase de raifort. La peroxydase de raifort génère un signal de couleur qui est proportionnel à la concentration d'antigènes dans une plage linéaire. Pour arrêter le développement de la couleur, une solution d'arrêt est ajoutée. Le degré de couleur généré est mesuré à une longueur d'onde de 450 nm.

Expérimentation

(Analyse des ingrédients alimentaires génétiquement modifiés, Manuel d'utilisation du Kit Soja (1999). Strategic Diagnostics, Inc., Rév. 052099, Vers. 1.8.)[1]

Introduction

Le protocole suivant expose une méthode ELISA permettant de déterminer la présence de la protéine CP4 EPSPS exprimée dans le soja Roundup Ready® dans les produits agricoles bruts tels que les farines de soja et les isolats de protéine de soja.

Cette méthode s'applique aux échantillons pour lesquels peu, voire aucun traitement n'a été effectué et la protéine CP4 EPSPS n'est ainsi pas dénaturée. Par exemple, la température à laquelle les ingrédients alimentaires sont transformés peut avoir un impact sur la capacité de détection des protéines. Les données indiquent que des

[1] Le kit décrit dans ce module était le seul protocole homologué disponible dans le commerce au moment où les formations étaient organisées et ce Manuel préparé. Le CCR et l'OMS ne promeuvent en aucun cas une marque spécifique de kits disponibles dans le commerce.

températures de traitement ne dépassant pas 65°C pendant au maximum 60 minutes permettent une détection fiable des protéines.

Cette méthode a été validée pour la détection de la protéine CP4 EPSPS et peut être mise en œuvre afin de déterminer la concentration de la protéine dans l'échantillon dans une gamme allant de 0,3% à 5% (pds/pds) en utilisant des matériaux de référence spécifiques. Le kit peut également être opéré à des niveaux de détection plus bas de 0,05% à 0,3% en utilisant un protocole modifié.

Equipement

Tubes centrifuges coniques de 15 ml en polypropylène
Eprouvettes en verre de 12 X 75 mm
Film en plastique ou feuille d'aluminium
Bande de plastique ou nettoyeur de plaque manuel
Pissettes, par ex. 500 ml
Pipettes de précision capables de fournir de 20 µl à 500 µl
Agitateur vortex
Coupelles ou équivalents
Spatules
Balance capable d'effectuer des mesures de 0,01 g
Centrifugeuse avec une capacité de 5000 à 10000 tr/mn
Lecteur de plaque de microtitration capable de relever l'absorbance à 450 nm
Incubateur capable de maintenir une température de 37°C
Tamis avec ouverture de 450 µm, ou équivalent
Tamis avec ouverture de 150 µm (maille 100), ou équivalent
Pipette multicanaux, par ex. de 50 µl à 300 µl (en option)
Réservoirs à réactif pour distribution multicanaux (en option)
Nettoyeur de plaque automatique (en option)
Portoirs pour tubes centrifuges de 15 ml (en option)

Réactifs

Généralités

Sauf spécification contraire, utiliser exclusivement durant l'analyse des réactifs de catégorie analytique convenable et de l'eau déionisée ou distillée.

Toute déviation par rapport aux critères de performance définis peut indiquer un manque de stabilité des réactifs. Si les composants du substrat ont déjà changé de couleur, passant de clair à bleu, ce réactif doit être éliminé. N'utiliser en aucun cas de solution tampon trouble.

Tous les composants du kit doivent être stockés à une température comprise entre 2°C et 8°C. La durée de vie des composants du kit est indiquée (cf. la date limite). En fonction des essais de stabilité dans des conditions de dégradation accélérée, la date d'expiration du kit d'essai a été fixée à 9 mois à une température comprise entre 2°C et 8°C.

La solution mère de conjugué d'anticorps « conjugué de soja » ainsi que la solution de travail de conjugué d'anticorps doivent être conservées à une température comprise entre 2°C et 8°C jusqu'à la date de péremption du kit. Le tampon de lavage dilué doit être stocké à une température comprise entre 2°C et 8°C, au plus tard jusqu'à la date d'expiration du kit.

Réactifs généralement fournis avec le kit d'essai

Tampon d'extraction de soja, tampon de borate de sodium, pH 7.5

Tampon d'essai de soja, solution saline tamponnée au phosphate, Tween 20, sérum albumine bovine, pH 7.4

Cupules à bande enduite (12 bandes contenant chacune 8 cupules enduites avec les anticorps de capture monoclonaux et 1 support de bande)

Conjugué de soja, protéine anti-CP4 EPSPS de lapin, sous forme lyophilisée

Support de conjugué de soja, 10% de sérum de souris inactivé thermiquement

Substrat chromogène, K-Blue™, tétraméthylbenzidine (TMB), peroxyde d'hydrogène, 5% de diméthylformamide en tant que solvant de base

Solution d'arrêt, 0,5% d'acide sulfurique

Concentré de tampon de lavage 10x, solution saline tamponnée au phosphate, Tween 20, pH 7.1

Etalons de référence négatifs et positifs

Procédure

Limitation de la procédure

Ce système d'essai ELISA se limite aux échantillons pour lesquels l'expression de la protéine CP4 EPSPS peut être mise en corrélation avec le niveau de matière GM présente dans les étalons de référence utilisés.

Le kit d'essai ELISA est conçu de manière à fournir des performances optimales à des températures ambiantes comprises entre 15°C et 30°C. L'absorbance de l'étalon de référence le plus élevé doit être supérieure à 0,8 et ne doit pas dépasser la plage linéaire du spectromètre (la limite supérieure varie en fonction des différents spectromètres). Il est important de tenir compte du fait que les valeurs OD augmentent plus rapidement lorsque les températures sont supérieures à 30°C. Par conséquent, si les températures sont élevées, un temps d'incubation réduit du substrat s'avérera nécessaire. Lorsque les températures sont basses (moins de 15°C), le temps d'incubation du substrat doit être augmenté.

Mesures permettant d'éviter toute contamination durant la préparation des échantillons

Généralités. Le test OGM ELISA est une technique extrêmement sensible qui est capable de détecter des quantités infimes de contamination GM. Il est donc impératif de nettoyer minutieusement l'ensemble du matériel utilisé pour traiter les échantillons de soja entre les différents lots d'échantillons. La procédure suivante implique une première étape d'élimination physique d'un maximum de particules. La seconde étape, un nettoyage à l'alcool, permet de dénaturer l'échantillon et de le rendre non réactif dans le cadre de l'essai â toute protéine GM ayant pu demeurer sur l'équipement.

Nettoyage du broyeur ou du mélangeur. Nettoyer de façon périodique à l'aide d'une brosse souple et laisser tremper dans une solution alcoolisée. Sécher la brosse avant toute utilisation ultérieure en l'essuyant à l'aide d'un chiffon doux ou d'une serviette de laboratoire.

Rincer avec de l'alcool, qui peut être stocké et pulvérisé à l'aide d'un flacon de pulvérisation ou d'injection. Deux rinçages ou pulvérisations sont recommandés. Ensuite, rincer minutieusement à l'eau. Sécher à l'air ; en cas de réutilisation rapide, sécher à l'aide d'un sèche-cheveux disponible dans le commerce.

Nettoyage du tamis. La poudre de soja a tendance à sécher et à se coller sur le tamis. Tapoter énergiquement le tamis contre une surface dure afin d'éliminer toute matière sèche collée dessus.

Brosser à l'aide d'une brosse souple et propre. Nettoyer la brosse de façon périodique et laisser tremper dans une solution alcoolisée pendant au moins 1 minute. Sécher la brosse avant toute utilisation ultérieure en l'essuyant avec un chiffon doux.

Laisser tremper dans de l'alcool pendant au moins 5 minutes et rincer soigneusement à l'eau . Sécher à l'air ; en cas de réutilisation rapide, sécher à l'aide d'un sèche-cheveux disponible dans le commerce.

Méthode alternative : utiliser un bain à ultrasons suivi par un séchage à l'air.

Propreté de la zone de travail. La propreté de la zone de travail est également capitale. Etant donné que l'essai est extrêmement sensible, la moindre contamination du tube par une faible quantité de poussière OGM pourrait entraîner un résultat positif erroné. Eviter toute contamination à la poussière de soja dans la zone de travail. Ne pas laisser de la poussière de soja contaminer l'équipement devant être utilisé dans le cadre d'une opération ultérieure. Pour des performances optimales, effectuer l'essai dans une salle séparée de l'installation de broyage et de préparation de l'échantillon afin d'éviter toute contamination de poussière éventuelle.

Préparation de l'échantillon

Un sous-échantillon homogène représentatif doit être prélevé sur l'échantillon de laboratoire.

Si l'échantillon est du soja brut, placer au moins 500 g dans un broyeur approprié et broyer pendant environ 3 minutes ou jusqu'à ce qu'il soit suffisamment fin pour traverser les tamis. Pour l'analyse quantitative, une dimension de particule inférieure à 150 µm doit être obtenue et moins de 450 µm pour l'analyse qualitative. Afin d'éviter toute contamination, procéder en faisant preuve de la plus grande vigilance durant l'étape de tamisage. Veiller également à éviter tout chauffage excessif. L'échantillon sera mélangé et broyé par le broyeur. Prélever de la matière broyée un sous-échantillon d'environ 100 g et le passer à travers un tamis avec des pores de 450 µm (maille 40). Faire passer au moins 90% de ce sous-échantillon à travers le tamis de 450 µm. Pour un essai qualitatif, cette matière peut être utilisée immédiatement ; pour un essai quantitatif, la matière tamisée doit l'être davantage à l'aide d'un tamis ayant des pores de 150 µm. Il a été démontré que la matière traversant le tamis de 450 µm est homogène ; il est donc nécessaire de tamiser juste

assez de matière pour obtenir un échantillon final à travers le tamis de 150 µm. Il suffit de passer la quantité de matière requise pour l'échantillon final.

D'autres types d'échantillons peuvent être traités de la même manière, bien que des tailles d'échantillons plus petites puissent être utilisés.

Procédure d'essai

Laisser l'ensemble des réactifs atteindre la température ambiante avant toute utilisation.

Oter les bandes enduites et retirer le support du sac en aluminium. Veiller systématiquement à refermer hermétiquement le sac en aluminium après avoir retiré le nombre de bandes approprié. Dix cupules sont nécessaires pour les étalons de référence et les « blancs ». Chaque plaque aura ses propres étalons et contrôles. En cas de nettoyage manuel, sceller à l'aide d'un ruban adhésif les bords de l'ensemble des bandes requises pour une opération au support de bandes afin d'éviter toute chute accidentelle des bandes hors du support pendant les étapes de nettoyage.

Préparation du conjugué d'anticorps

Solution mère de conjugué d'anticorps. Pipeter 1 ml de diluant de conjugué de soja de la bouteille dans le tube correspondant. Vortexer pendant environ 10 secondes.

Solution de travail de conjugué d'anticorps. Transférer à nouveau 240 µl de conjugué de soja reconstitué dans le flacon de diluant de conjugué de soja. Etiqueter le flacon en indiquant la date et mélanger en le retournant 20 fois.

Préparation du tampon de lavage

Laisser le concentré de tampon de lavage 10X atteindre la température ambiante.

Diluer le concentré de tampon de lavage 10X dans de l'eau déionisée pour préparer le tampon de lavage de travail (par ex. 50 ml de concentré de tampon de lavage 10X dans 450 ml d'eau déionisée).

Ajouter au nettoyeur de plaque automatique ou à la pissette.

Extraction d'échantillons et étalons de référence

Les échantillons et les étalons de référence négatifs et positifs sont extraits dans les mêmes conditions en deux exemplaires, comme décrit ci-après.

Lors du pesage des échantillons, peser chaque étalon de référence par ordre croissant de concentration, puis les échantillons.

Peser 0,5 g $\pm$ 0,01 g de chaque étalon de référence et l'échantillon dans des tubes individuels de 15 ml en polypropylène. Afin d'éviter toute contamination, nettoyer la spatule avant toute nouvelle pesée.

Ajouter 4,5 ml de tampon d'extraction de soja dans chaque tube contenant 0,5 g d'échantillon et vortexer pendant 10 secondes.

Centrifuger les mélanges à environ 5000 tr/mn pendant 15 minutes.

A l'aide d'une pipette de transfert, retirer soigneusement le surnageant sans aspirer les particules et placer le surnageant dans un tube propre de 15 ml étiqueté.

Avant de procéder à l'essai, diluer les extraits d'échantillon et d'étalon de référence avec le tampon d'essai de soja conformément au Tableau 1.

Les extraits de protéine doivent être stockés à une température comprise entre 2°C et 8°C, pendant une journée au maximum.

Tableau 1. Plages de dilution en fonction de la matrice

Matrice	Dilution
Soja	1:300
Farine de soja	1:300
Farine de soja dégraissée	1:300
Isolat de protéine	1:10

Dilution des extraits d'échantillon

Pour le contrôle négatif extrait, pour chaque contrôle positif extrait et pour chaque échantillon, deux tubes à essai de 12 X 75-mm sont nécessaires pour effectuer la dilution.

Pipeter 280 µl du tampon d'essai de soja dans l'un des tubes à essai de 12 x 75-mm.

Pipeter 380 µl du tampon d'essai de soja dans l'autre tube à essai de 12 x 75-mm.

Etiqueter le tube de 280 µl tube « 1:15 » et celui de 380 µl « 1:300 ».

Pipeter 20 µl de chaque extrait d'échantillon dans le tube étiqueté « 1:15 » et vortexer.

Transférer 20 µl du tube « 1:15 » mélangé vers celui étiqueté « 1:300 » et vortexer.

Répéter ces étapes pour le contrôle négatif, chaque référence positive et les extraits d'échantillon.

Procédure d'immuno-essai ELISA

Généralités

Le kit d'essai ELISA peut être opéré dans différents formats en utilisant n'importe quel numéro de bandes de 8 cupules. Il est recommandé de suivre un plan de chargement aléatoire.

Deux exemplaires sont nécessaires pour l'ensemble des cupules de réaction et la valeur d'absorbance moyenne de chaque cupule est calculée. Chaque opération comprend le blanc (tampon d'essai), le contrôle négatif et les étalons de référence positifs.

Lorsqu'un essai est entamé, toutes les étapes doivent être effectuées sans interruption.

Ajout d'échantillon

Ajouter 100 µl d'extraits dilués ainsi que le blanc aux cupules appropriées.

Utiliser des pointes jetables séparées pour chaque étape de pipetage afin d'éviter toute contamination croisée. Couvrir la plaque avec un film en plastique ou une feuille d'aluminium afin d'éviter toute contamination ou évaporation.

Incubation de l'échantillon

Incuber la plaque de microtitration à 37°C pendant 1 heure.

Lavage

Laver 3 fois à l'aide de 300 µl de tampon de lavage.

Lavage manuel. Vider les cupules en les retournant au-dessus d'un évier ou d'un récipient approprié. A l'aide d'une pissette de 500 ml contenant une solution de lavage de travail, remplir chaque cupule à ras bord, laisser reposer pendant 60 secondes, puis vider la plaque comme décrit ci-dessus. Répéter l'étape de lavage 3 fois. Eliminer le liquide résiduel ainsi que les bulles en tapotant à l'envers sur plusieurs couches de papier.

Eviter toute chute des bandes hors du cadre en utilisant du ruban adhésif.

Lavage automatique. A la fin de la période d'incubation, aspirer le contenu de l'ensemble des cupules à l'aide d'un nettoyeur de microcupule, puis remplir les

cupules avec du tampon de lavage. Répéter l'étape d'aspiration/remplissage 3 fois. Enfin, utiliser le nettoyeur de microcupule pour aspirer l'ensemble des cupules, puis tapoter la plaque à l'envers sur une pile de serviettes en papier afin d'éliminer toute goutte résiduelle ainsi que les bulles du tampon de lavage.

Ne pas laisser sécher la cupule, cela risquerait d'affecter les performances de l'essai. Un lavage insuffisant entraînera des résultats erronés. Quel que soit le type de nettoyeur utilisé (manuel ou automatique), veiller impérativement à ce que chaque cupule d'essai soit nettoyée avec des volumes identiques à toutes les autres cupules.

Ajout d'un conjugué d'anticorps

Ajouter 100 µl de solution de travail de conjugué d'anticorps à chaque cupule.

Couvrir la plaque afin d'éviter toute contamination ou évaporation.

Incubation

Incuber la plaque de microtitration à 37°C pendant 1 heure.

Lavage

A la fin de la période d'incubation, répéter les étapes de lavage comme décrit ci-dessus.

Ajout de substrat

Ajouter 100 µl de la solution colorée à chaque cupule.

Mélanger doucement la plaque et incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

L'ajout de substrat chromogène doit être effectué sans interruption. Conserver la même séquence et le même intervalle de temps à l'étape de pipetage. Protéger la plaque de microtitration contre les rayons du soleil, sans quoi cela influerait sur l'intensité de la couleur.

Ajout d'une solution d'arrêt

A la fin de la période d'incubation, ajouter 100 µl de solution d'arrêt à chaque cupule, pipeter la solution d'arrêt dans la même séquence que l'ajout du réactif de couleur.

L'ajout d'une solution d'arrêt doit être effectué sans interruption. Protéger la plaque de microtitration contre les rayons du soleil, sans quoi cela influerait sur l'intensité de la couleur.

Lecture de l'absorbance

A l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration équipé d'un filtre permettant d'effectuer une lecture à 450 nm, mesurer l'absorbance de chaque cupule d'essai.

Tous les relevés doivent être effectués dans un délai de 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

Enregistrer les résultats obtenus et calculer les valeurs d'absorbance moyennes ou utiliser un programme informatique à cet effet.

Evaluation

Les valeurs des étalons doivent être utilisées pour réaliser la courbe d'étalonnage. La valeur du blanc doit être ôtée de l'ensemble des valeurs pour les échantillons et étalons de référence. Les valeurs corrigées moyennes de chaque point de référence en double doivent être utilisées pour réaliser la courbe d'étalonnage. Les données moyennes de chaque échantillon en dupliquât doivent ensuite être utilisées pour déterminer leur concentration sur la base de cette courbe.

Application des critères d'admissibilité/de rejet

Chaque opération devra respecter les critères d'admissibilité/de rejet dans le cadre de la procédure pour être valable. L'opération comprend les éléments suivants : tare d'essai (blanc), extraction de chaque étalon OGM de référence, contrôle négatif et chaque échantillon inconnu. Tous les extraits de protéine ainsi que la tare d'essai seront traités en deux exemplaires. Si une procédure n'observe pas les critères d'admissibilité de l'essai, l'opération tout entière sera renouvelée.

Opération	Critères
Tare de tampon d'essai	A450nm < 0,30
0% norme GM	A450nm < 0,30
2,5% Référence	A450nm $\geq$ 0,8
Toutes les normes positives	CV des doubles $\leq$ 15%
Echantillons inconnus	CV des doubles $\leq$ 20%

Schéma de fonctionnement

Etablissement d'un schéma de fonctionnement de l'extraction d'échantillon et de la référence standard

Procédure	Volume/poids	Description
Pesage	0,5 g	Pesage des échantillons, tare d'essai, étalons de référence
Ajout	4,5 ml	Ajout du tampon d'extraction
Mélange		Mélange de l'échantillon avec le tampon d'extraction jusqu'à ce qu'il soit homogène
Centrifugation	5000 tr/mn	Centrifuger l'échantillon à 5000 tr/mn pendant 15 minutes Eliminer le surnageant et le placer dans un tube propre
Dilution	1:300 ou 1:10 en fonction de la matière examinée	Diluer les échantillons et les étalons de référence

Etablissement d'un schéma de fonctionnement de la procédure d'immuno-essai ELISA

Procédure	Volume	Description
Ajout	100 µl	Pipeter les extraits d'échantillons dilués, étalons de référence et tare d'essai dans une cupule d'essai appropriée
Incubation		Incuber pendant 1 heure à 37°C
Lavage		Laver 3 fois à l'aide du tampon de lavage
Ajout	100 µl	Ajouter le conjugué d'anticorps dans chaque cupule d'essai
Incubation		Incuber pendant 1 heure à 37°C
Lavage		Laver 3 fois à l'aide du tampon de lavage
Ajout	100 µl	Ajouter la solution de couleur dans chaque cupule
Incubation		Incuber pendant 10 minutes à température ambiante
Ajout	100 µl	Ajouter la solution d'arrêt dans chaque cupule d'essai
Mesure de l'absorbance		Mesurer la valeur de l'absorbance de chaque cupule d'essai dans le lecteur de plaque à 450 nm

Références

Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Caractéristiques de la méthode de dosage immunoenzymatique avec microplaque en vue de la détection de phytovirus. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.

Hemmer, W. (1997). Aliments dérivés d'organismes génétiquement modifiés et méthodes de détection. *Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology – Rapport* 2/97, 61 pages. http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php (Dernière connection Janvier 2010).

Lipp, M., Anklam, E. & Stave, J.W. (2000). Validation d'un immuno-essai en vue de la détection et de la quantification de soja génétiquement modifié dans des aliments et fractions de denrées alimentaires à l'aide de matières de référence. *Journal of AOAC International* **83**, 919–927.

Longstaff, M., Edmonds, H.S. & Newell, C.A. (1995). Méthode améliorée pour la détection et la quantification de protéine recombinante dans les plantes transgéniques. *Plant Molecular Biology Reporter* **13**, 363–368.

Mohapatra, U., Mccabe, M.S., Power, J.B., Schepers, F., Vanderarend, A. & Davey, M.R. (1999). L'expression du gène bar confère à la laitue transgénique une résistance à l'herbicide. *Transgenic Research* **8**, 33–44.

Padgette, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. & Kishore, G.M. (1995). Mise au point, identification et caractérisation d'une lignée de soja tolérante au glyphosate. *Crop Science* **35**, 1451–1461.

Autres références

Brett, G.M., Chambers, S.J., Huang, L. & Morgan, M.R.A. (1999). Conception et mise au point d'immuno-essais en vue de la détection de protéines. *Food Control* **10**, 401–406.

directive 79/700/CEE de la Commission du 24 juillet 1979 fixant des méthodes communautaires de prélèvement d'échantillons pour le contrôle officiel des résidus de pesticides sur et dans les fruits et légumes. JO L 239, 22.9.1979, p. 24.

Rogan, G.J. Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R. & Fuchs, R.L. (1999). Méthodes immunodiagnostiques en vue de la détection de la 5-énolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase dans le soja Roundup Ready®. *Food Control* **10**, 407–414.

Stave, J. W. (1999). Détection de protéines nouvelles ou modifiées dans les nouveaux aliments issus d'OGM – besoins futurs. *Food Control* **10**, 367–374.

Van der Hoeven, C., Dietz, A. & Landsmann, J. (1994). Variabilité de l'expression génique spécifique aux organes des plantes de tabac transgéniques. *Transgenic Research* **3**, 159–165.